

Received: 2005.08.16
Accepted: 2005.11.25
Published: 2005.12.08

VEGF jako czynnik angiogeny, neurotroficzny i neuroprotektoryjny*

VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor

Magdalena Namiecińska¹, Katarzyna Marciniak², Jerzy Z. Nowak^{1,2}

¹ Centrum Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk, Łódź

² Zakład Farmakologii Katedry Farmakologii i Farmakologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Streszczenie

Czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF – występujący w kilku izoformach: VEGF-A, -B, -C, -D) jest dobrze poznanym czynnikiem mitogennym komórki i czynnikiem wzrostu i przepuszczalności naczyń. VEGF uczestniczy w angiogenezie fizjologicznej i „terapeutycznej”, w angiogenezie patologicznej, a także w procesie rozwoju naczyń limfatycznych. VEGF uczestniczy we wszystkich fazach angiogenezy, przy czym jego rola na etapie inicjacji tworzenia nowych naczyń krwionośnych wydaje się szczególnie ważna. Prace z ostatnich lat podkreślają, że oprócz głównej funkcji proangiogennej, VEGF przejawia również aktywność neurotroficzną i neuroprotektoryjną w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym, bezpośrednio oddziałując na neurony, komórki Schwanna, astrocyty, macierzyste komórki nerwowe i mikroglej. VEGF realizuje swoje działania biologiczne przez interakcję z trzema podtypami receptora VEGF, znanymi jako VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) i VEGFR-3 (Flt-4), wszystkie mają wewnętrzną domenę kinazy tyrozynowej. Aktywacja poszczególnych podtypów receptorów VEGF obecnych w błonie komórkowej uruchamia we wnętrzu danej komórki wiele torów sygnalizacyjnych, m.in. PI3K/Akt, Ras/Raf-MEK/Erk, eNOS/NO, IP₃/Ca²⁺, które uczestniczą w generacji swoistej odpowiedzi biologicznej związanej z takimi procesami, jak np. proliferacja, migracja, zwiększenie przepuszczalności naczyń czy zwiększenie przeżywalności komórek. Ostatnie wyniki doświadczeń przeprowadzonych na zwierzętach z wywołanym lokalnym niedokrwieniem mózgu sugerują, że aktywność neuroprotektoryjna VEGF przebiega równolegle z jego zdolnością do inicjowania neurogenezy i angiogenezy, niezależnie jako mechanizm wielostopniowy. Sądzi się, że trzy główne cechy charakteryzujące aktywność biologiczną VEGF, tj. angiogeneza, neuroprotekcja i neurogeneza, wraz z ich funkcjonalnymi połączeniami, mogą się stać podstawą do opracowywania nowych strategii terapeutycznych opartych na wykorzystaniu z jednej strony VEGF (i/lub jego pochodnych), a z drugiej – struktur neutralizujących ten czynnik lub blokujących receptory VEGF, zmierzających do skutecznego przeciwdziałania wielu groźnym patologiom, wśród nich zmianom poischemicznym w schorzeniach kardiologicznych i neurologicznych, wzrostowi guzów litych, czy rozrostowi naczyń krwionośnych w strukturach awaskularnych narządu wzroku.

Słowa kluczowe:

czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) • receptory VEGF • angiogeneza • neurogeneza • neuroprotekcja • potencjał terapeutyczny agonistów i antagonistów receptorów VEGF

Summary

Vascular endothelial growth factor (VEGF, occurring in several isoforms: VEGF-A, -B, -C, -D) is a well-known endothelial cell mitogen and vascular growth and permeability factor. Recent

*Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi (grant nr 502-11-245) oraz środki statutowe Centrum Biologii Medycznej PAN w Łodzi.

work done over the last few years has elucidated the important role of VEGF, which participates in the regulation of normal (physiological or therapeutic) and pathological angiogenesis (VEGF-A, VEGF-B) and lymphangiogenesis (VEGF-C, VEGF-D). VEGF has also been implicated in practically every stage of angiogenesis, yet its role in the initiation of new blood vessel creation appears to be the most important. In addition to its role as a key angiogenic factor, VEGF also possesses neurotrophic and neuroprotective activity both in the peripheral and in the central nervous system, exerting a direct action on neurons, Schwann cells, astrocytes, neural stem cells, and microglia. VEGF interacts with three subtypes of VEGF receptors occurring on the cellular membrane known as VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR), and VEGFR-3 (Flt-4). All these receptor types possess an internal tyrosin kinase domain. Interaction of VEGF with particular subtypes of receptors activates a circuit of signaling pathways, e.g. PI3K/Akt, Ras/Raf-MEK/Erk, eNOS/NO, and IP_3/Ca^{2+} . These participate in the generation of specific biological responses connected with proliferation, migration, increasing vascular permeability, or promoting endothelial cell survival. Recent findings from experiments performed on animals with experimentally evoked focal cerebral ischemia suggest that the neuroprotective activity of VEGF runs in parallel with its ability to promote neurogenesis and angiogenesis and that these effects may operate independently through multiple mechanisms. The above-mentioned three major features characterizing the neurobiological activity of VEGF, i.e. neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis, together with their possible functional link(s), provide the rationale for considering VEGF-based therapy as a promising future avenue for a more effective treatment of at least some neurodegenerative disorders and stroke. Moreover, the possibility of using neutralizing factors of VEGF or VEGF receptor antagonists may reveal a way of preventing many dangerous pathologies, including post-ischemic disturbances in cardiac and neurological disorders, tumor growth, or hypervascularization in avascular structures of the eye.

Key words: vascular endothelial growth factor (VEGF) • angiogenesis • lymphangiogenesis • neuroprotection • neurogenesis • VEGF receptors • therapeutic potential of VEGF receptor agonists and antagonists

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/8523.pdf

Word count: 3374

Tables: 2

Figures: 3

References: 76

Adres autora: prof. dr hab. med. Jerzy Z. Nowak, Zakład Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź; Centrum Biologii Medycznej PAN, ul. Lodowa 106, 93-233 Łódź; e-mail: jznowak@pharm.am.lodz.pl

Wykaz skrótów: VEGF - czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor); VEGF-A, -B, -C, -D, -E - izoformy VEGF; VEGFR-1, -2, -3 - receptory VEGF; HIF-1 - czynnik indukowany hipoksją (hypoxia inducible factor-1); NRP-1, -2 - neuropilina-1, -2.

Historia czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF – vascular endothelial growth factor) sięga roku 1983, kiedy to Senger i wsp. opisali czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń (VPF – vascular permeability factor) [58]. Po sklonowaniu w 1989 r. VPF [29] i VEGF [33], a także czynnika znanego jako waskulotropina (vasculotropin) [29], okazało się, że wszystkie wymienione cząsteczki reprezentują ten sam czynnik, charakteryzujący się wybitnym działaniem proangiogenym, wynikającym z bezpośredniej aktywacji komórek śródbłonna naczyń. O fizjologicznej istotności VEGF świadczyły wyniki doświadczeń, w których wykazano, że zarodki pozbawione genu VEGF ginęły przed urodzeniem nawet wówczas, gdy wyłączono tylko jeden allel tego genu; śmierć zarodków następowała około 10 dnia ciąży, a tworzenie naczyń krwionośnych było całkowicie zaburzone [5,17]. Doświadczenia te dały początek dalszym badaniom poświęconym proangiogenemu działaniu VEGF.

W ostatnich latach spore nadzieje wiąże się z przejawianą przez VEGF aktywnością neurotroficzną i neuroprotekcijną [4,65]. Wdrożenie VEGF do terapii chorób o podłożu neurodegeneracyjnym oraz przebiegających z niedokrwieniem tkanki nerwowej wymaga jeszcze wielu badań i prób klinicznych. Jednakże, wyniki dotychczasowych doświadczeń przeprowadzonych na zwierzętach i hodowlach neuronalnych rokuja pomyślnie.

BUDOWA I FUNKCJA CZYNNIKÓW RODZINY VEGF

Do rodziny VEGF zalicza się 6 czynników: VEGF-A, -B, -C, -D, PlGF (łożyskowy czynnik wzrostu; placenta growth factor) i VEGF-E (czyli wirusowy homolog VEGF; orf-virus VEGF) [1,24,26,41,48,50]. Ich wspólną cechą jest występowanie w cząsteczce fragmentu zawierającego sekwencję cystein, dzięki którym możliwe jest wytwarzanie mostków siarczkowych i tworzenie dimerów [4,39,48,49,52].

Tabela 1. Właściwości czynników rodziny VEGF

| | VEGF-A | VEGF-B | VEGF-C | VEGF-D | PLGF | VEGF-E |
|--|---------------------------------|------------|--------|--------|------------|--------|
| Lokalizacja genu | 6p21.3 | 11q13 | 4q34 | Xp21.1 | 14q24 | orf |
| Liczba eksonów | 8 | 7 | 7 | 7 | 7 | - |
| Liczba aminokwasów w cząsteczce (ludzie) | 121 145 165 189 206 | 167 186 | 415 | 358 | 131 152 | 149* |
| Liczba aminokwasów w cząsteczce (myszy) | 144 164 188 | 167 186 | 415 | 358 | 149 | - |
| Podobieństwo do VEGF-A (%) | 100 | 43 | 30 | 31 | 46 | 25 |

* liczba aminokwasów w cząsteczce wirusowego VEGF

Poszczególne czynniki są produktami ekspresji różnych genów, różnią się między sobą także strukturą cząsteczki, podobieństwem do VEGF-A (uznawanego za prototyp rodziny) oraz wykazują odmienne działanie biologiczne (tab. 1).

Najlepiej poznanym czynnikiem jest VEGF-A, którego gen jest umiejscowiony na ramieniu krótkim chromosomu 6 (6p21.3) i zawiera 8 eksonów i 7 intronów [4,39]. Produktem ekspresji tego genu jest mRNA, na bazie którego, w wyniku alternatywnego składowania, powstają izoformy VEGF-A, różniące się między sobą liczbą aminokwasów w cząsteczce: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ oraz VEGF₂₀₆ [29,33,60,71]. VEGF-A jest zaangażowany przede wszystkim w proces tworzenia naczyń oraz zwiększania ich przepuszczalności. Właściwości biologiczne tego czynnika, a zwłaszcza jego biodostępność i zdolność pobudzania proliferacji komórek są zależne od powinowactwa, jakie poszczególne izoformy VEGF-A wykazują w stosunku do heparyny. VEGF₁₂₁ wykazuje znacznie mniejszą zdolność wiązania heparyny i występuje przede wszystkim w formie dyfuzyjnej, co sprawia, że jego biodostępność jest znacznie lepsza niż VEGF₁₈₉, który ściśle przylega do powierzchni komórki dzięki związaniu z fragmentami przypominającymi swą budową cząsteczkę heparyny. Zatem stopień powinowactwa do heparyny determinuje właściwości biologiczne VEGF. Utrata tego powinowactwa, związana z alternatywną obróbką mRNA, powoduje 50% redukcję zdolności mitogennych wykazywanych przez VEGF [17].

VEGF-B jest wiązany z progresją guzów nowotworowych niezależną od angiogenezy. Gen tego czynnika zawiera 7 eksonów i położony jest w ramieniu długim chromosomu 11 (11q13) [53]. Produktem jego ekspresji jest pre-pro-białko, które w procesie obróbki potranslacyjnej ulega przekształceniu do dwóch izoform, zawierających odpowiednio 167 i 186 aminokwasów [49,50]. U gryzoni izoformy VEGF składają się z identycznej liczby aminokwasów, a ich podobieństwo do czynnika ludzkiego wynosi 88% [50].

VEGF-C zawiera 415 aminokwasów i jest produktem ekspresji genu, znajdującego się w ramieniu długim chromosomu 4 (4q34) [53]. Jego stężenie zależy od cytokin prozapalnych oraz aktywacji makrofagów, natomiast nie jest

zależne od hipoksji. Czynnikiem ten uczestniczy w stymulacji proliferacji i migracji komórek śródbłonka oraz przyczynia się do zwiększenia przepuszczalności naczyń. Powoduje również hiperplazję naczyń chłonnych skóry [8,27].

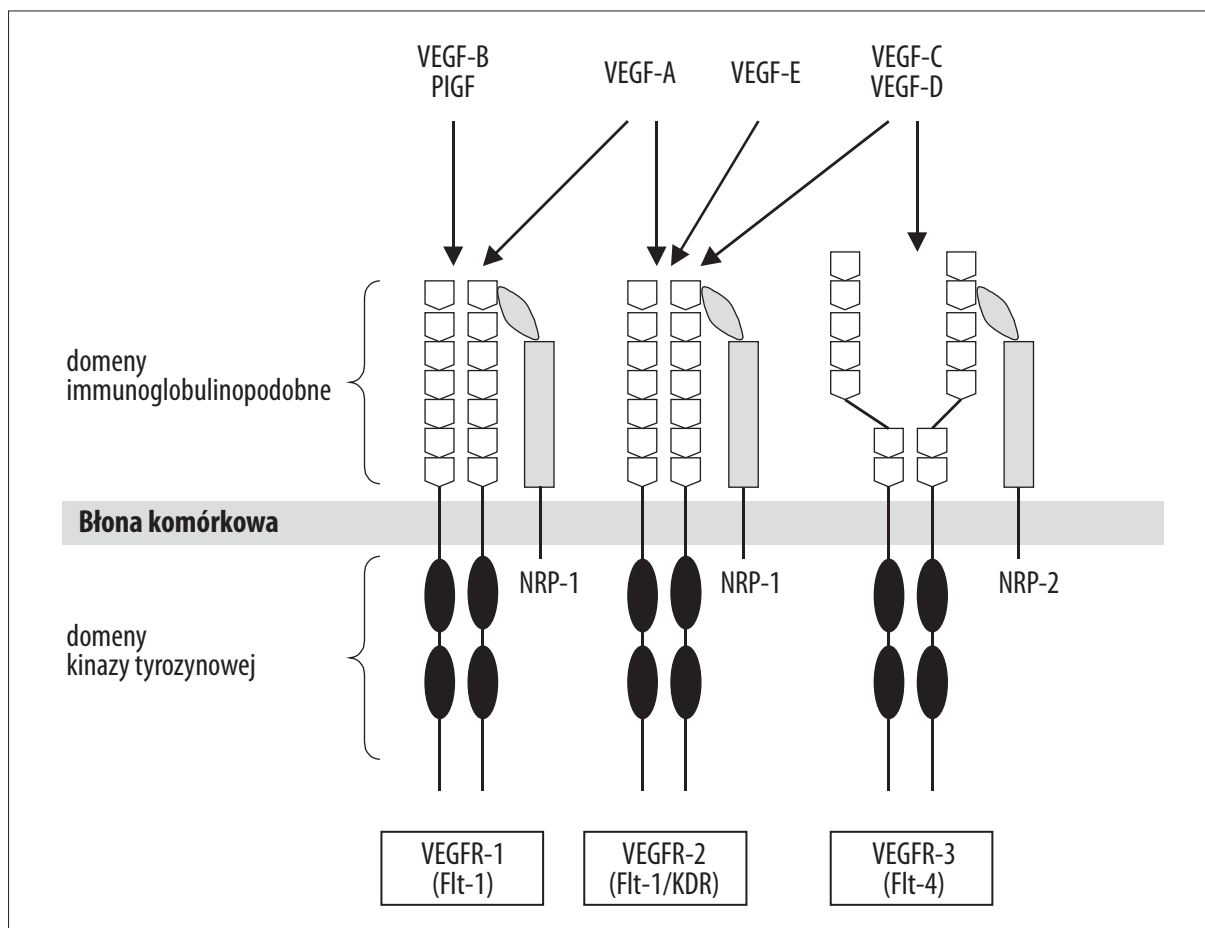
VEGF-D występuje w postaci cząsteczki zawierającej 358 aminokwasów, kodowanej przez gen, którego *locus* znajduje się w ramieniu krótkim chromosomu X (Xp21.1) [50]. Czynnikiem ten stymuluje proliferację komórek śródbłonka naczyń chłonnych. Wykazuje właściwości angiogenne zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Zwiększenie ekspresji tego czynnika w keratynocytach stymuluje tworzenie naczyń chłonnych w skórze. Obserwacje wykazały obecność produktów ekspresji VEGF-D także w melanocytach, fibroblastach oraz mezenchymie płuc [8,27].

Gen PLGF jest położony na długim ramieniu chromosomu 14 (14q24-31) [39], a jego produktem są dwie izoformy zawierające odpowiednio 131 i 152 aminokwasy [17,35]. Wzrost stężenia tego czynnika obserwowano w stanach, takich jak proces nowotworowy, zawał mięśnia sercowego, czy retinopatie. PLGF stymuluje wzrastanie komórek śródbłonka i komórek mięśni gładkich, jest chemoatraktantem komórek uczestniczących w zapaleniu. Może powodować mobilizację komórek mononuklearnych ze szpiku kostnego. Działając synergistycznie z VEGF-B wpływa na różnicowanie i aktywację monocytów [8,27].

VEGF-E, peptyd zawierający 149 aminokwasów, swą strukturą w 25% odpowiada strukturze VEGF-A [48] i jest czynnikiem wytwarzanym tylko przez wirusa orf. Wirus ten powoduje uszkodzenia skóry u owiec i kóz. Zmiany te są związane z rozległą angiogenezą naczyń włosowatych i tworzeniem włóknistych torebek. Obecne są w nich także cechy zwiększonej przepuszczalności naczyń oraz proliferacji komórek śródbłonka. Według innych autorów czynnikiem ten ma spełniać rolę modulatora środowiska gospodarza, natomiast nie jest istotny w procesie replikacji wirusa [8,27].

INDUKCJA SYNTEZY VEGF

Wiele typów komórek ma zdolność syntezy VEGF, np. komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych, makrofagi,



Ryc. 1. Schemat budowy receptorów VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3: Flt-1 – fms like tyrosine kinase, Flk-1 – fetal liver kinase-1, KDR – kinase domain region, NRP-1,-2 – neuropilina-1,-2

fibroblasty, a także komórki śródbłonna. Do najbardziej istotnych czynników silnie stymulujących syntezę VEGF w komórce należy hipoksja [11,13,57,76]. Ponadto wymienić należy również: cytokiny (np. IL-1 β , TNF- α), czynniki wzrostowe (bFGF, PDF czy TGF- β), hormony, onkogeny, tlenek azotu (NO), reaktywne formy tlenu oraz chelatory żelaza [13,14,17,64].

W warunkach ograniczonego dostarczania tlenu obserwowano znaczne zwiększenie ekspresji VEGF, rejestrowane jako zwiększenie stężenia VEGF-mRNA, np. w komórkach glejaka wielopostaciowego, w których występowały ogniska martwicy [68]. Zawartość VEGF-mRNA w tych niedotlenionych komórkach była zdecydowanie większa, niż w komórkach niewykazujących cech nekrozy. Podobną zależność zauważono w komórkach mięśnia sercowego świni, pozbawionych ukrwienia na skutek zamknięcia gałęzi zstępującej tętnicy wieńcowej lewej. Poddane niedokrwieniu komórki wykazywały znacząco wyższą zawartość VEGF-mRNA niż komórki prawidłowo natlenione [20].

Zwiększenie ekspresji genu VEGF pod wpływem niedotlenienia komórek wiąże się z powstawaniem w tych komórkach czynnika indukowanego hipoksją, tzw. HIF-1 (hypoxia inducible factor-1), który oddziałuje z krótką sekwencją DNA w rejonie promotora VEGF, tzw. HRE (hypoxia response element) i przez to nasila ekspresję VEGF [57,76].

Czynnik HIF-1 α jest aktywny tylko wówczas, gdy podjednostka α połączy się z podjednostką β . W warunkach fizjologicznych stabilność HIF1- α jest ściśle regulowana dzięki procesowi jego stałego unieczynniania w wyniku ubiquitylizacji [32].

Synteza HIF-1 α , a więc pośrednio również VEGF, może być stymulowana również przez hemoksygenazę 1 (HO-1) – enzym, którego stężenie znacznie wzrasta w stanach niedotlenienia, zwłaszcza w obszarze ośrodkowego układu nerwowego. HO-1 jest wydzielana przez makrofagi, migrujące do centrum niedotlenienia, a także przez komórki śródbłonna. W warunkach fizjologicznych HO-1 odpowiada za degradację hemu do CO, Fe²⁺ oraz biliwerdyny. Produkty rozpadu hemu są naturalnymi czynnikami chroniącymi komórkę przed wolnymi rodnikami, a tlenek węgla wykazuje również działanie pośredniczące w rozszerzaniu naczyń, w wyniku aktywacji cyklazy guanylanowej i zwiększania stężenia cyklicznego GMP (cGMP) [13,30,76].

RECEPTORY IZOFORM VEGF

Działania biologiczne wszystkich członków rodziny VEGF są realizowane przez swoje receptory: VEGFR-1 (zwany również Flt-1 – fms like tyrosine kinase), VEGFR-2 (FLK-1 – fetal liver kinase-1 u myszy i KDR – kinase domain region u człowieka) i VEGFR-3 (Flk-4 – fetal liver

kinase-4), znajdujące się na powierzchni komórek docelowych [16,27,43]. Receptory VEGF należą do nadrodziny receptorów zawierających domenę kinazy tyrozynowej, które mają zdolność do autofosforylacji. Zjawisko to zachodzi po aktywacji receptora, indukowanej przyłączeniem liganda. Receptory te są homodimerami i składają się z trzech funkcjonalnych elementów: zewnątrzkomórkowego, który składa się z siedmiu domen immunoglobulinopodobnych, transbłonowego (domena hydrofobowa) oraz z wewnątrzkomórkowego, zawierającego domenę o aktywności kinazy tyrozynowej (ryc.1).

Badania kompleksu VEGF-VEGFR-1 wykazały, że tylko domeny 2 i 3 elementu zewnątrzkomórkowego pozostają w bliskim kontakcie z ligandem i są wystarczające do jego związania. Ponadto, trzy pierwsze domeny immunoglobulinopodobne są konieczne do uzyskania pełnego powinowactwa w jego wiązaniu [3,10,21,42,73].

Poszczególne izoformy VEGF wykazują powinowactwo do różnych typów receptora. Izofорма VEGF-A oddziałuje z receptorem VEGFR-1 i VEGFR-2 [8]. Ponadto, ligandami receptora VEGFR-1 są VEGF-B i PlGF [50]. Z kolei na receptor VEGFR-2 działają także VEGF-C i VEGF-D. Ligandami receptora VEGFR-3 są VEGF-C i VEGF-D [1,26] (ryc.1). Ekspresja VEGFR-1 zachodzi głównie w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych, ponadto w monocytach, makrofagach, w trofoblaście łożyska i w komórkach mezangialnych nerki. Ekspresja VEGFR-2 występuje w komórkach śródbłonka naczyń krwionośnych, ale także w megakariocytach, płytkach krwi oraz w krwiotwórczych komórkach macierzystych i komórkach macierzystych siatkówki. Natomiast ekspresja VEGFR-3 zachodzi głównie w komórkach śródbłonka limfatycznego. Ogólnie można zatem powiedzieć, że receptory VEGFR-1 i VEGFR-2 biorą udział w angiogenezie, podczas gdy receptory VEGFR-3 w limfoangiogenezie [8,17,24,23,31]. Wykazano, że receptor VEGFR-1 może występować w postaci rozpuszczalnej (sVEGFR-1, sFlt-1) [43]. Nie jest znana rola fizjologiczna tego typu receptora, ale są pewne sugestie, że mógłby on wiązać VEGF we krwi i w ten sposób zapobiegać stymulacji śródbłonka. A zatem, rolą receptora VEGFR-1 może być ograniczanie nadmiernej, nie zawsze korzystnej aktywności VEGF.

Ekspresja receptorów VEGF jest uzależniona m.in. od hipoksji, co zostało potwierdzone w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach [16,19]. Przewlekłe niedotlenienie u szczurów wywoływało zwiększenie liczby receptorów VEGFR-1 i VEGFR-2 na komórkach śródbłonka naczyń płucnych. Podobny efekt obserwowano w naczyniach niedokrwionego mięśnia sercowego. Natomiast *in vitro* zaobserwowano zwiększenie o 50% ekspresji VEGFR-1 w naczyniach włosowatych siatkówki bydłowej, czemu jednocześnie towarzyszyło zmniejszenie liczby receptorów VEGFR-2 [37].

CZYNNIKI MODULUJĄCE AKTYWNOŚĆ VEGF

Działanie VEGF jest wspomagane przez czynniki modulujące jego aktywność. Do czynników tych należą neuropeptyny 1 i neuropeptyny 2 (NRP-1 i NRP-2), pełniące funkcje koreceptorów. Te transbłonowe białka, złożone z dużej domeny zewnątrzkomórkowej i ogona zanurzonego w cy-

toplazmie, są niezbędne w przewodnictwie nerwowym i w regulacji angiogenezy [22,60,61]. Ich ekspresja zachodzi głównie w zakończeniach aksonów, w komórkach śródbłonkowych naczyń krwionośnych i w niektórych komórkach nowotworowych [60,61]. NRP-1 wzmacnia wiązanie VEGF₁₆₅ do receptora VEGFR-2 [22]. Natomiast NRP-2 wiąże VEGF-C, a jej ekspresja zachodzi razem z VEGFR-3 w komórkach śródbłonka subpopulacji naczyń limfatycznych [28]. Badania wykonane na myszach wykazały, że nadekspresja NRP powoduje anomalie w układzie nerwowym i naczyniowym serca, co dowodzi istotnej ich roli w rozwoju organizmu. Zarówno NRP-1 jak i NRP-2 są również niezbędnymi składnikami w wiązaniu semaforyny3 (Sema3A), istotnego regulatora neurogenezy, co jest koniecznym warunkiem przekazywania sygnału w niektórych szlakach [65].

Etapy transdukcji sygnału receptorowego

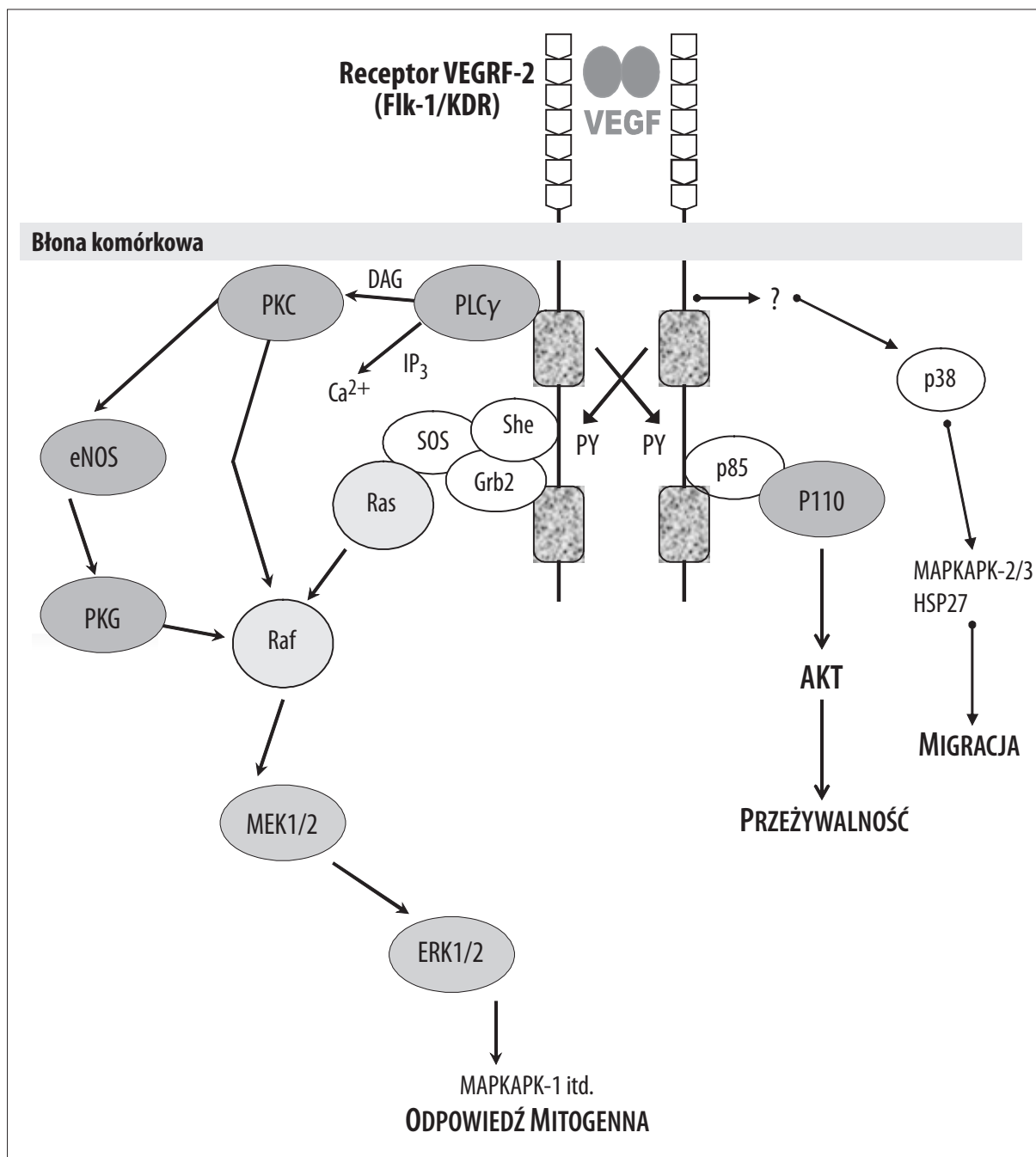
Interakcja VEGF z receptorem wywołuje wzajemną fosforylację podjednostek receptora, co wywołuje aktywację różnych szlaków sygnałowych w komórce (ryc. 2). [12,20]. Jest to pierwszy, niezbędny etap sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, indukowanej przez VEGF. Efekt końcowy wywierany przez ten czynnik zależy jednak od dalszych wewnątrzkomórkowych losów przekazywanego pobudzenia.

Najlepiej poznana wydaje się ścieżka aktywowana przez receptor VEGFR-2. Ufosforylowane receptory służą jako miejsca przyłączenia dla wewnątrzkomórkowych enzymów i cząsteczek adaptorowych, którymi są: Shc i Grb2. Cząsteczki te wiążąc kompleks SOS-Ras, prowadzą do aktywacji białka Ras, a przez to do inicjacji ścieżki Ras→Raf→kinazy MAP. Ścieżka ta pośredniczy w aktywacji proliferacji śródbłonka [9]. Ponadto, aktywacja VEGFR-2 powoduje przyłączenie fosfolipazy C-gamma (PLC-γ), która odcina część fosfatydyloinozytolu od jego miejsca zakotwiczenia w lipidzie, uwalniając w ten sposób zmagazynowane fosforany inozytolu (IP₃). Te ostatnie z kolei prowadzą do uwalniania Ca²⁺ z puli jonów wewnątrzkomórkowych. Powstający razem z IP₃ diacyloglicerol (DAG) pozostaje w sąsiedztwie błony komórkowej i jest fizjologicznym aktywatorem kinazy białkowej C (PKC). Aktywacja PKC jest związana z migracją i przepuszczalnością naczyń pod wpływem VEGF [70,74]. Przepuszczalność naczyń indukowana przez VEGF zależy również od tlenu azotu (NO), wytwarzanego z L-argininy przez śródbłonkową syntazę NO (eNOS) [40].

Oprócz swojej funkcji angiogennej i neuroprotektynnej VEGF wpływa także na migrację komórek endotelialnych. Niestety, pierwszy etap tego szlaku pozostaje dotąd nieznan. Wiadomo jedynie, że następuje indukcja ścieżki sygnalizacyjnej SAPK2/p38 [37,56].

ROLA VEGF W PROCESIE ANGIOGENEZY

Proces tworzenia nowych naczyń rozpoczyna się już w okresie zarodkowym. U myszy w 7 dniu po zapłodnieniu w pęcherzyku żółtkowym z migrujących komórek mezodermalnych powstają wyspy krwiotwórcze [7]. W ciągu kolejnych 12 godzin komórki te różnicują się w kierunku komórek hematopoetycznych pnia (HPCs – hematopoietic cells) oraz prekursorowych komórek śródbłonka



Ryc. 2. Schemat głównych dróg transdukcji sygnału indukowanych przez VEGFR-2: PKC – kinaza białkowa C (protein kinase C), DAG – diacyloglicerol (1,2-diacylglycerol), PLC γ – fosfolipaza C typu γ (phospholipase C γ), IP₃ – inozytolo-(1,4,5)-trifosforan (inositol-1,4,5-trisphosphate), eNOS – syntaza tlenu azotu (endothelial nitric-oxide synthase), NO – tlenek azotu (nitric oxide), PKG – kinaza białkowa G (protein kinase G), Raf – jedna z białkowych kinaz serynowo-treoninowych, Ras – rodzina małych białek G, powodujących aktywację GTP-azy, SOS – aktywator wymiany nukleotydów guaninowych, Shc – białko adapterowe, Grb2 – białko adapterowe (growth factor receptor-bound 2), MEK1/2 – kinaza kinaz MAP (miogen-activated protein kinase kinase), ERK1/2 – kinazy aktywowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe (extracellularly regulated protein kinases), PI-3K – kinaza 3-fosfatydiloinozytolu (phosphatidy-3-inositol kinase), HSP-27 – białko szoku ciepłego (heat shock protein-27)

(EPCs – epithelial precursor cells), które rozmieszcza- ją się odpowiednio w centralnej i obwodowej części wyspy. W dalszym etapie środkowa część podejmuje czynność krwiotwórczą, natomiast obwodowa przekształca się w pierwotne naczynia krwionośne [75]. Ten etap określa- ny jest terminem waskulogenezy. Zaobserwowano zależ-

ność tego procesu od VEGF, wytwarzanego już w stadium gastruli przez komórki endodermy i mezodermy. Ważnym czynnikiem regulującym jest obecność receptora VEGFR-2 (Flk-1) na powierzchni komórek progenitorowych. Zarodki pozbawione genu VEGF lub niewykazujące ekspresji tego receptora nie były zdolne do wytworzenia wysp krwio-

Tabela 2. Główne etapy angiogenezy i udział czynników proangiogennych

| Lp. | Etapy angiogenezy | Czynniki biorące udział |
|-----|---|--|
| 1 | Aktywacja komórek śródbłonna | VEGF , FGF, PDGF |
| 2 | Degradacja błony podstawnej istniejących naczyń i macierzy zewnątrzkomórkowej | MMP, UPA i uPAR, integryny, VEGF , bFGF |
| 3 | Formowanie nowych naczyń | VEGF , bFGF, PDGF, angiopoetyna |

Wśród wymienionych czynników znajdują się te najistotniejsze, których rola w procesie powstawania naczyń jest bezwzględnie konieczna. Należy jednakże podkreślić, że w zależności od miejsca w jakim dochodzi do tworzenia naczyń, a także warunków towarzyszących całemu procesowi, rola wielu innych czynników proangiogennych (ale także antyangiogennych) jest równie istotna.

twórczych i obumierały w tym stadium [59]. Aktywacja receptora VEGFR-2 na powierzchni komórek endotelialnych wyzwała ich różnicowanie i migrację, natomiast aktywacja komórek mezodermalnych stymuluje różnicowanie w kierunku linii śródbłonkowej oraz komórek mięśni gładkich. Stanowi to podstawę do rozpoczęcia angiogenezy, czyli dalszego rozwoju naczyń na podłożu struktur już istniejących.

Proces ten zachodzi również w życiu postnatalnym. Jest dominującym sposobem powstawania naczyń w licznych procesach naprawczych, takich jak gojenie się ran czy w zjawiskach fizjologicznych (owulacja, przekrwienie ściany macicy w cyklu menstruacyjnym, dojrzewanie kości, wzrost włosów) [16,17,19]. Również w dojrzałym organizmie VEGF jest tym czynnikiem, który – głównie poprzez receptory typu VEGFR-2 – inicjuje aktywację i różnicowanie progenitorowych komórek endotelialnych w kierunku komórek śródbłonna [2], podziały tych komórek, a także degradację błony podstawnej istniejących oraz formowanie nowych naczyń (tab. 2). VEGF uczestniczy zatem we wszystkich stadiach angiogenezy.

W powstawaniu i dojrzewaniu naczyń uczestniczą, oprócz VEGF, również inne czynniki, o charakterze zarówno stymulującym (np. angiogenina, angiopoetyna, czynnik wzrostu fibroblastów – FGF, transformujący czynnik wzrostu – TGF, płytkopochodny czynnik wzrostu – PDGF), jak i hamującym ten proces (angiostatyna, endostatyna, trombospondyna, czy czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego – PEDF). Przesunięcie równowagi na korzyść tych pierwszych stymuluje rozwój naczyń krwionośnych. Funkcjonalna dominacja czynnika/ów proangiogennych niekoniecznie musi się wiązać z jego/ich aktywacją; może ona wynikać z pierwotnego obniżenia wytwarzania i poziomu czynnika/ów angiostatycznych [47].

Zaburzenia tworzenia naczyń, będące skutkiem zachwiania równowagi pomiędzy czynnikami stymulującymi i hamującymi angiogenezę, leżą u podstaw wielu chorób, do których zalicza się m.in.: choroby naczyń (naczyniaki, naczyńniakowatość, malformacje tętniczo-żylna, blaszki miażdżycowe), choroby stawów (zmiany stawowe u hemofilików, reumatoidalne zapalenie stawów), choroby skóry (łuszczyca, sklerodermia), choroby oka (retinopatia proliferacyjna, zwłóknienie zasoczkowe, jąglica). Niektóre z nich są bardzo groźne np.: retinopatia w postaci proliferacyjnego zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD) jest jedną z najczęstszych na świecie przyczyn śle-

poty [45]. Angiogeneza odgrywa także niepodważalną rolę w rozwoju chorób nowotworowych [6,17,55].

ROLA VEGF W PROCESIE NEUROGENEZY I NEUROPROTEKCJI

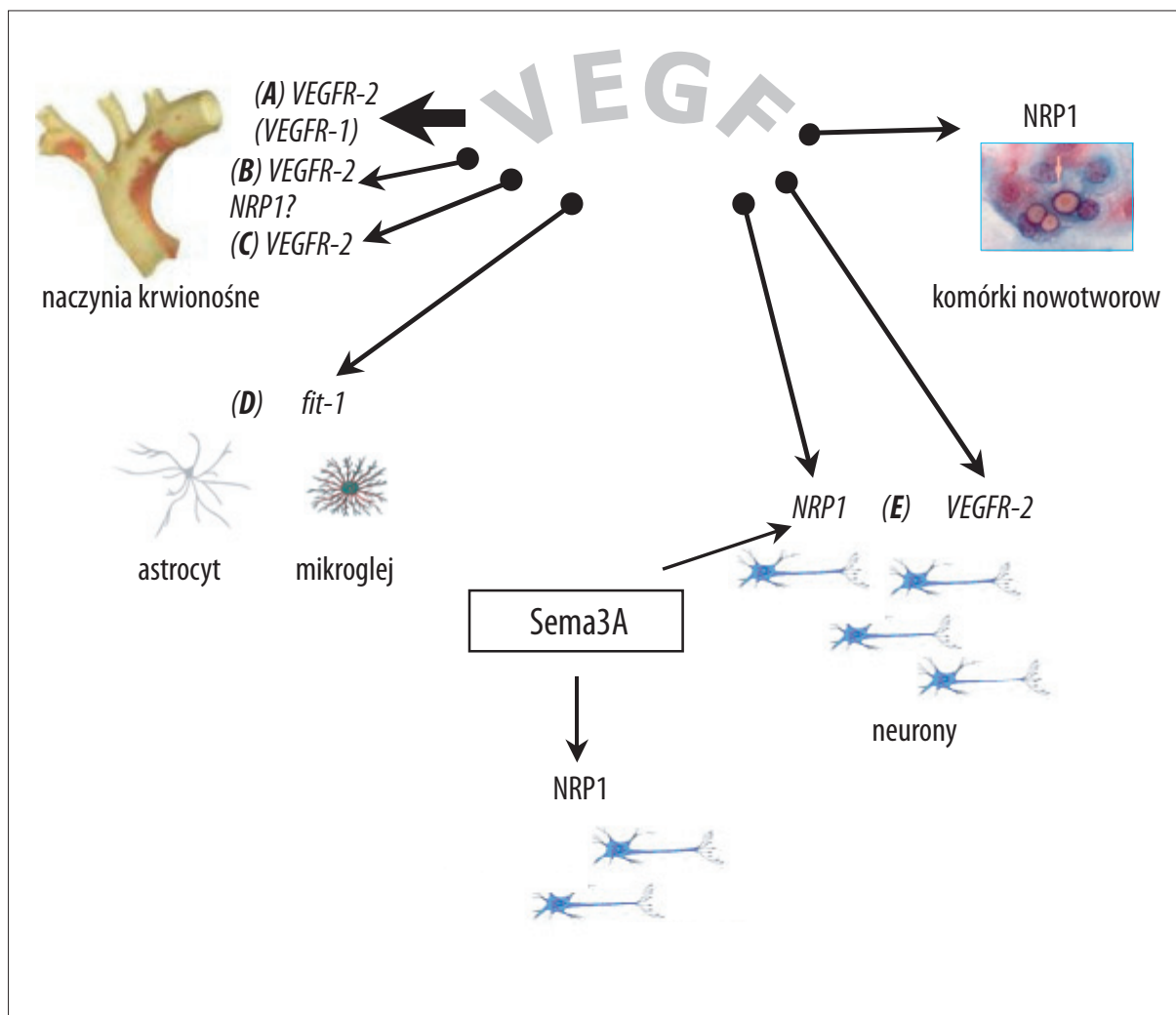
Prace z ostatnich lat wykazują, że oprócz podstawowej funkcji proangiogennej, VEGF przejawia również aktywność neurotroficzną i neuroprotekcijną zarówno w ośrodkowym, jak i w obwodowym układzie nerwowym [4,23,62,66].

Liczne badania dowodzą, że aktywność VEGF w układzie nerwowym realizuje się przez dwie ścieżki sygnalizacyjne: PI3K/Akt i/lub MEK/ERK. Wiadomo bowiem, że VEGF podnosi poziom ufosforylowanego Akt (dzięki przyłączeniu i fosforylacji podjednostki regulatorowej p38 PI3-kinazy do aktywowanych podjednostek receptora) i ufosforylowanej ERK. Efekt ten jest osiągnięty tylko przez receptory VEGFR-2 [65]. Dodanie do komórek inhibitorów kinaz, takich jak wortmanina czy LY2940002, hamuje indukowaną przez VEGF fosforylację Akt bez wpływu na ERK i odwrotnie: inhibitor MEK – UO126 blokuje aktywność ERK bez wpływu na Akt; dodanie obu inhibitorów jednocześnie, tj. wortmaniny i UO126, skutkuje addycyjnym efektem hamowania [38]. Te obserwacje sugerują, że Akt i ERK będąc niezbędnymi ogniwami w mechanizmie działania VEGF, są ulokowane na różnych ścieżkach aktywowanych przez ten czynnik.

VEGF jako czynnik stymulujący neurogenezę

W układzie nerwowym rola VEGF nie ogranicza się tylko do regulacji wzrostu naczyń, czynnik ten może bowiem oddziaływać bezpośrednio na różne typy komórek nerwowych, w tym także na komórki macierzyste (NSC – neural stem cells). Jego obecność wykryto też w innych komórkach tkanki nerwowej, m.in. neuronach oraz komórkach glejowych [4,62].

VEGF stymuluje wzrost i przeżywalność komórek Schwanna w warunkach hipoksji, a także zwiększa proliferację i migrację astrocytów. Wykazano, że VEGF wytwarzany przez komórki ependymy (komórki wyściółki układu komorowego mózgu i rdzenia) stymuluje proliferację prekursorów neuronalnych oraz zwiększa wzrost komórek prekursorowych w strefie podkorowej (SCZ) i podziarnistej (SGZ) zakrętu zębatego (DG) hipokampa przez oddziaływanie na receptory VEGFR-2. Pobudza również neurogenezę przez stymulację komórek śródbłonna do uwalniania czynników neurotroficznycych. Ponadto VEGF stymuluje wzrost



Ryc. 3. Różne ścieżki w komórce indukowane przez czynnik: (A) VEGF indukuje angiogenezę głównie przez receptory VEGFR-2 (flk-1); (B) neuroangiogeneza również wiąże się z czynnikiem VEGF; (C) duża dawka zastosowanego czynnika VEGF powoduje obrzęk mózgu przez wzrost przepuszczalności naczyń i ich niedojrzałość, co pociąga za sobą krwotok; (D) VEGF powoduje proliferację i dojrzewanie astrocytów i komórek mikroglejowych; (E) VEGF pełni funkcje neuroprotektynowe bezpośrednio przez receptor VEGFR-2 (flk-1) oraz może hamować apoptozę neuronów indukowaną przez semaforynę 3A (Sema3A), znaną jako czynnik zmniejszający obrzęk, poprzez współzawodnictwo w wiązaniu NRP; (F) ekspresja NRP na powierzchni komórek rakowych może być związana z chemotaksją i angiogenezą komórek w tkankach sąsiadujących

aksonów w hodowlach siatkówki, czy zwojów nerwowych korzenia grzbietowego (DRG) [62,63]. Dodanie VEGF wywołuje reakcję nie tylko w miejscu podania w okolicy aksonów, ale także w ciele komórki nerwowej. Świadczy to o istnieniu wstecznego transportu aksonalnego tego czynnika i być może jest dowodem na istnienie jeszcze jednej drogi oddziaływania na rozrost aksonów [63].

VEGF jako czynnik neuroprotektynowy

Dowodzono, że w warunkach *in vitro* VEGF zwiększa przeżywalność komórek nerwowych w warunkach hipoksji, stresu oksydacyjnego, pozbawienia surowicy, co wykazano w badaniach prowadzonych na komórkach HN33 (mysie komórki hipokampa) oraz na neuronach kory mózgowej [51]. VEGF znacznie redukuje także cytotoksyczny wpływ glutamianu [38,69] czy mutantu SOD-1 [32], dzięki czemu również zwiększa przeżywalność komórek.

Mechanizm tej ochrony polega na hamowaniu indukowanej przez glutamian nadekspresji kaspazy 3 – głównego mediatora apoptotycznej śmierci komórek nerwowych.

Neuroprotektynowy wpływ VEGF potwierdzono również w badaniach *in vivo* przeprowadzonych na szczurach, u których wywoływano niedokrwienie ośrodkowego układu nerwowego przez okluzję tętnicy środkowej mózgu [36,68]. W obszarze pozbawionym ukrwienia obserwowano wzrost stężenia VEGF-mRNA. Dokomorowe podanie przeciwciał skierowanych przeciwko VEGF powoduje natomiast powiększenie strefy zawału oraz nasila zmiany degeneracyjne w neuronach. VEGF zastosowany bezpośrednio na powierzchnię mózgowia wywołuje zmniejszenie strefy niedokrwiennej, a jego dożylnie podanie prowadzi do redukcji uszkodzeń w neuronach. Podobny efekt wywiera jednorazowe dokomorowe podanie plazmidów zawierających gen VEGF₁₆₅, jednak musi zostać wykonane przed upływem 2

godzin od wywołania niedokrwienia [65]. Egzogenne zastosowanie VEGF działa neuroprotekcynie i stymuluje dojrzewanie nowych neuronów, które powstają w obszarze objętym hipoksją, nie wpływa natomiast na angiogenezę i proliferację gleju. Jednak duże dawki tego czynnika wykazują głównie działanie proangiogenne, co może prowadzić do obrzęku strefy zawału i pogorszenia rokowania [36].

Nadal niewyjaśniony pozostaje wpływ działania angiogenego i neuroprotekcynowego VEGF na prawidłowe funkcjonowanie neuronów objętych ochroną oraz nowo powstałych w obszarze niedokrwienia. Wy tłumaczenie tego problemu i wyjaśnienie zawikłych zależności między angiogenezą i neuroprotekcją indukowaną przez VEGF stwarza możliwości lepszego zrozumienia patogenezy wielu chorób neurodegeneracyjnych i otwiera nowe, obiecujące możliwości ich leczenia (ryc. 3).

VEGF I KOMÓRKOWE MECHANIZMY INDUKOWANE PRZEZ VEGF JAKO PUNKT UCHWYTU DLA NOWYCH STRATEGII TERAPEUTYCZNYCH

W ostatnich latach VEGF stał się obiecującym czynnikiem w walce z chorobami, w których dochodzi do upośledzenia angiogenezy. Przypuszczano, że podanie VEGF, czy też nawet wstrzyknięcie odpowiedniego wektora zawierającego gen tego czynnika, przyspieszy tworzenie nowych naczyń krwionośnych w niedokrwionym mięśniu sercowym czy mięśniach kończyn dolnych [72]. Duże nadzieje wiązano z możliwościami zastosowania VEGF w profilaktyce restenozy, czyli ponownego zwężenia światła tętnicy po zabiegach angioplastyki (poszerzania naczyń wieńcowych częściowo zamkniętych przez blaszki miażdżycowe). Badania przeprowadzone na szczurach i królikach sugerowały, że przyspieszenie odnowy śródbłonna zniszczonego podczas zabiegu może zapobiec wystąpieniu tego niekorzystnego zjawiska. VEGF wydawał się doskonałym kandydatem do tego celu. I zapewne nim jest. Ale, problematyczne okazało się dopasowanie modeli zwierzęcych do sytuacji panującej w ludzkich naczyniach zmienionych miażdżycowo. Okazało się bowiem, że VEGF występuje w dużych

ilościach w blaszkach miażdżycowych [11]. Ponadto, nie spodziewano się wystąpienia groźnych dla życia działań niepożądanych terapii proangiogennej [15]. Należy mieć nadzieję, że ujemne strony proponowanej terapii z zastosowaniem VEGF zostaną wyeliminowane.

Wiele pytań i zagadnień dotyczących VEGF zostaje jeszcze niewyjaśnionych. Funkcja neuroprotekcynowa tego czynnika, jakkolwiek jeszcze nie do końca poznana i zrozumiana, rokuje nadzieje na przyszłość. VEGF może być potencjalnym lekiem w walce z chorobami, w których podłożem procesu chorobowego jest niedobór tego czynnika. Dotyczyć to może pacjentów z zaburzeniami, u podstaw których leży proces neurodegeneracji. VEGF może również stać się pomocny w terapii ograniczającej skutki udarów ośrodkowego układu nerwowego oraz podczas późniejszej rehabilitacji neurologicznej tych pacjentów [36,68]. Miejscowe zastosowanie VEGF u chorych po przebytym zawale mięśnia sercowego, mające na celu poprawę uciążliwych uszkodzonego obszaru, mogłoby być alternatywą dla leczenia inwazyjnego. Jednakże w chorobach, takich jak starcze zwyrodnienie plamki (AMD), to patogenetyczne jest inne. Podstawowym problemem wysiękowej – proliferacyjnej postaci AMD okazuje się bowiem pojawienie się VEGF i jego działanie angiogenne w rejonie choriokapilarów, skutkujące inwazją nowo utworzonych naczyń w obszarach fizjologicznie pozbawionych tego uciążliwego [45,46]. Prowadzi to do stopniowego pogorszenia, a w końcowym etapie do całkowitej utraty wzroku. Zatem, w chorobach o takim podłożu celowe wydaje się poszukiwanie substancji neutralizujących nadmiar VEGF lub blokujących receptory tego czynnika, w celu uniemożliwienia dalszego przekazywania sygnału do komórki.

Okazuje się więc, że terapeutyczne zastosowanie zarówno czynnika VEGF w chorobach wywołanych jego niedoborem, jak i ograniczenie negatywnych skutków jego nadmiaru, wymaga nadal wielu badań, których wyniki przesądzą o możliwości praktycznego wykorzystania zdobytej wiedzy.

PIŚMIENICTWO

- [1] Achen M.G., Jeltsch M., Kukk E., Makinen T., Vitali A., Wilks A.F., Alitalo K., Stackman S.A.: Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flk4). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 548–553
- [2] Asahara T., Kawamoto A.: Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004; 287: C572–C579
- [3] Barleon B., Totzke F., Herzog C., Blanke S., Kremmer E., Siemeister G., Marme D., Martiny-Baron G.: Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 10382–10388
- [4] Brockington A., Lewis C., Wharton S., Shaw P.J.: Vascular endothelial growth factor and the nervous system. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2004; 30: 427–446
- [5] Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeys S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoek A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W., Nagy A.: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996; 380: 435–439
- [6] Carmeliet P., Jain R.: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000; 407: 249–257
- [7] Choi K., Kennedy M., Kazarov A., Papadimitriou J.C., Kelle G.: A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, 1998; 125: 725–732
- [8] Clausen M.: Molecular biology of the VEGF and VEGF receptor family. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2000; 26: 561–569
- [9] D'Angelo G., Martini J.F., Iiri T., Fantl W.J., Martial J., Weiner R.I.: 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol. Endocrinol.*, 1999; 13: 692–704
- [10] Davis-Smyth T., Chen H., Park J., Presta L.G., Ferrara N.: The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO J.*, 1996; 15: 4919–4927
- [11] Dor Y., Keshet E.: Ischemia-driven angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 1997; 7: 289–294
- [12] Dougher M., Terman B.I.: Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene*. 1999; 18: 1619–1627
- [13] Dulak J., Józkwicz A.: Rola cytokin, tlenku azotu i oksygenazy hemowej-1 w angiogenezie. W: Szlaki przekazywania sygnałów komórkowych – XXI Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN, Mogilany 2004 (red. Nalepa I.). Inst. Farmakol. PAN, 2004; 115–122
- [14] Enholm B., Paavonen K., Ristimäki A., Kumar V., Gunji Y., Klefstrom J., Kivinen L., Laiho M., Olofsson B., Joukov V., Eriksson U., Alitalo K.: Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene*. 1997; 14: 2475–2483

- [15] Epstein S.E., Kornowski R., Fuchs S., Dvorak H.F.: Angiogenesis therapy: amidst the hype, the neglected potential for serious side effects. *Circulation*, 2001; 104: 115–119
- [16] Ferrara N.: Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin. Oncol.*, 2002; 29 (6 Suppl. 16): 10–14
- [17] Ferrara N.: Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2001; 280: C1358–C1366
- [18] Ferrara N., Davis-Smith T.: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endor. Rev.*, 1997; 18: 4–25
- [19] Folkman J.: Clinical application of research on angiogenesis. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333: 1757–1763
- [20] Fong T.A., Shawver L.K., Sun L., Tang C., App H., Powell T.J., Kim Y.H., Schreck R., Wang X., Risau W., Ullrich A., Hirth K.P., McMahon G.: SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.*, 1999; 59: 99–106
- [21] Fuh G., Li B., Crowley C., Cunningham B., Wells J.A.: Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 11197–11204
- [22] Gluzman-Poltorak Z., Cohen T., Herzog Y., Neufeld G.: Neuropilin-2 and neuropilin-1 are receptors for the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF) and of placenta growth factor-2, but only neuropilin-2 functions as a receptor for the 145-amino acid form of VEGF. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 18040–18045
- [23] Góra-Kupilas K., Joško J.: The neuroprotective function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Folia Neuropathol* 2005; 43: 31–39
- [24] Hauser S., Weich H.A.: A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta. *Growth Factors.*, 1993; 9: 259–268
- [25] Jeltsch M., Kaipainen A., Joukov V., Meng X., Lakso M., Rauvala H., Swartz M., Fukumura D., Jain R.K., Alitalo K.: Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*, 1997; 276: 1423–1425
- [26] Joukov V., Pajusola K., Kaipainen A., Chilov D., Lahtinen I., Kukk E., Saksela O., Kalkkinen N., Alitalo K.: A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.*, 1996; 15: 290–298
- [27] Jussila L., Alitalo K.: Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol. Rev.*, 2002; 82: 673–700
- [28] Karkkainen M.J., Saariisto A., Jussila L., Karila K.A., Lawrence E.C., Pajusola K., Bueler H., Eichman A., Kauppinen R., Kettunen M.I., Yla-Herttuala S., Finegold D.N., Ferrell R.E., Alitalo K.: A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98: 12677–12682
- [29] Keck P.J., Hauser S.D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J., Connolly D.T.: Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, 1989; 246: 1309–1312
- [30] Kimura H., Esumi H.: Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim. Pol.* 2003; 50: 49–59
- [31] Kukk E., Lymboussaki A., Taira S., Kaipainen A., Jeltsch M., Joukov V., Alitalo K.: VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*, 1996; 122: 3829–3837
- [32] Lee J.W., Bae S.H., Jeong J.W., Kim S.H., Kim K.W.: Hypoxia-inducible factor (HIF-1 α): its protein stability and biological functions. *Exp. Mol. Med.*, 2004; 36: 1–12
- [33] Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J., Goeddel D.V., Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 1989; 246: 1306–1309
- [34] Li B., Xu W., Luo C., Gozal D., Liu R.: VEGF-induced activation of the PI3-K/Akt pathway reduces mutant SOD1-mediated motor neuron cell death. *Mol. Brain Res.*, 2003; 111: 155–164
- [35] Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Delli-Bovi P., Persico M.G.: Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to vascular permeability factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 9267–9271
- [36] Manoonkitiwongsa P.S., Schultz R.L., McCreery D.B., Whitter E.F., Lyden P.D.: Neuroprotection of ischemic brain by vascular endothelial growth factor is critically dependent on proper dosage and may be compromised by angiogenesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2004; 24: 693–702
- [37] Marumo T., Schini-Kerth V.B., Busse R.: Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes*, 1999; 48: 1131–1137
- [38] Matsuzaki H., Tamatani M., Yamaguchi A., Namikawa K., Kiyama H., Vitek M.P., Mitsuda N., Tohyama M.: Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. *FASEB J.*, 2001; 15: 1218–1220
- [39] Mattei M.G., Borg J.P., Rosnet O., Marme D., Birnbaum D.: Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively. *Genomics*, 1996; 32: 168–169
- [40] Mayhan W.G.: VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. *Am. J. Physiol.*, 1999; 276: C1148–1153
- [41] Meyer M., Clauss M., Lepple-Wienhues A., Waltenberger J., Augustin H.G., Ziche M., Lanz C., Buttner M., Rziha H.J., Dehio C.: A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signaling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.*, 1999; 18: 363–374
- [42] Muller Y.A., Christinger H.W., Keyt B.A., De Vos A.M.: The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure*, 1997; 5: 1325–1338
- [43] Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.*, 1999; 13: 9–22
- [44] Norrby K.: Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS*, 1997; 105: 417–437
- [45] Nowak J.Z.: Rola lipofuscywn w etiopatogenezie zwyrodnienia plamki związanej z wiekiem (AMD). *Mag. Okul.*, 2005; II/2: 103–114
- [46] Nowak J.Z.: Druzy, złogi podstawne, proces zapalny i zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (AMD). *Mag. Okul.*, 2005; II/3: 174–184
- [47] Nowak J.Z., Wiktorowska-Owczarek A.: Neowaskularyzacja w tkankach oka: mechanizmy i rola czynników pro- i antyangiogenychn. *Klinika Oczna*, 2004; 106: 90–97
- [48] Ogawa S., Oku A., Sawano A., Yamaguchi S., Yazaki Y., Shibuya M.: A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 31273–31282
- [49] Olofsson B., Pajusola K., Kaipainen A., von Euler G., Joukov V., Saksela O., Orpana A., Pettersson R.F., Alitalo K., Eriksson U.: Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 2576–2581
- [50] Olofsson B., Pajusola K., von Euler G., Chilov D., Alitalo K., Eriksson U.: Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 19310–19317
- [51] Oosthuysen B., Moons L., Storkebaum E., Beck H., Nuyens D., Brusselmans K., Van Dorpe J., Hellings P., Gorselink M., Heymans S., Theilmeier G., Dewerechin M., Laudenbach V., Vermeylen P., Raat H., Acker T., Vlemminckx V., Van Den Bosch L., Cashman N., Fujisawa H., Drost M.R., Scot R., Bruyninckx F., Hicklin D.J., Ince C., Gressens P., Lupu F., Plate K.H., Robberecht W., Herbert J.M., Collen D., Carmeliet P.: Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.*, 2001; 28: 131–138
- [52] Orlandini M., Marconini L., Ferruzzi R., Oliviero S.: Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 11675–11680
- [53] Paavonen K., Horelli-Kuitunen N., Chilov D., Kukk E., Pennanen S., Kallioniemi O.P., Pajusola K., Olofsson B., Eriksson U., Joukov V., Palotie A., Alitalo K.: Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively. *Circulation*, 1996; 93: 1079–1082
- [54] Paper D.H.: Natural products as angiogenesis inhibitors. *Planta Med.*, 1998; 64: 686–695
- [55] Pluda J.M.: Tumor-associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications, and therapeutic strategies. *Semin. Oncol.*, 1997; 24: 203–218
- [56] Rousseau S., Houle F., Landry J., Huot J.: p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*, 1997; 15: 2169–2177
- [57] Semenza G.L.: Perspectives on oxygen sensing. *Cell*, 1999; 98: 281–184

- [58] Senger D.R., Connolly D.T., Van der Water L., Feder J., Dvorak H.F.: Putrification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res.*, 1990; 50: 1774–1778
- [59] Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitman M.L., Schuh A.C.: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995, 376: 62–66
- [60] Soker S., Fidler H., Neufeld G., Klagsbrun M.: Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 5761–5767
- [61] Soker S., Takashima S., Miao H.Q., Neufeld G., Klagsbrun M.: Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 1998; 92: 735–745
- [62] Sondell M., Lundborg G., Kanje M.: Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J. Neurosci.*, 1999; 19: 5731–5740
- [63] Sondell M., Sundler F., Kanje M.: Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur. J. Neurosci.*, 2000; 12: 4243–4254
- [64] Stein I., Neeman M., Shweiki D., Itin A., Keshet E.: Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol. Cell. Biol.*, 1995; 15: 5363–5368
- [65] Storkebaum E., Carmeliet P.: VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J. Clin. Invest.*, 2004; 113: 14–18
- [66] Storkebaum E., Lambrechts D., Carmeliet P.: VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays*, 2004; 26: 943–954
- [67] Sun F.Y., Guo X.: Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. *J. Neurosci. Res.*, 2005; 79: 180–184
- [68] Sun Y., Jin K., Xie L., Childs J., Mao X.O., Logvinova A., Greenberg D.A.: VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Clin. Invest.*, 2003; 111: 1843–1851
- [69] Svensson B., Peters M., König H.G., Poppe M., Levkau B., Rothermundt M., Arolt V., Kogel D., Prehn J.H.: Vascular endothelial growth factor protects cultured rat hippocampal neurons against hypoxic injury via an antiexcitotoxic, caspase-independent mechanism. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2002; 22: 1170–1175
- [70] Takahashi T., Shibuya M.: The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*, 1997; 14: 2079–2089
- [71] Tischer E., Gospodarowicz D., Mitchell R., Silva M., Schilling J., Lau K., Crips T., Fiddes J.C., Abraham J.A.: Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989; 165: 1198–1206
- [72] von Degenfeld G., Banfi A., Springer M.L., Blau H.M.: Myoblast-mediated gene transfer for therapeutic angiogenesis and arteriogenesis. *Br. J. Pharmacol.*, 2003; 140: 620–626
- [73] Wiesmann C., Fuh G., Christinger H.W., Eigenbrot C., Wells J.A., de Vos A.M.: Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell*, 1997; 91: 695–704
- [74] Wu H.M., Yuan Y., Zawieja D.C., Tinsley J., Granger H.J.: Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability. *Am. J. Physiol.*, 1999; 276: H535–H542
- [75] Yamashita J., Itoh H., Hirashima M., Ogawa M., Nishikawa S., Yurugi T., Naito M., Nakao K.: Flk-1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, 2000, 408: 92–96
- [76] Zagórska A., Dulak J.: HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxic sensing. *Acta Biochim. Pol.*, 2004; 51: 563–585